

BIOFERTILIZANTES A PARTIR DO USO DE FONTES DE NUTRIENTES DE BAIXA REATIVIDADE E MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES

R. Klaić^{1,2,*}, C. P. Fávoro^{1,2}, L. A. Lodi^{1,2}, C. Ribeiro¹, C. S. Farinas^{1,2}

¹ Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro 1452, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

² Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

* Autor correspondente, e-mail: rodrigoklaic@yahoo.com.br

Resumo: O aumento na produtividade de alimentos está diretamente ligado ao aumento no consumo de fertilizantes na agricultura. Entretanto, os métodos clássicos de produção de fertilizantes podem causar impactos ambientais e a saúde do ser humano. Portanto, este estudo tem por objetivo apresentar um método alternativo para a produção de biofertilizantes, baseado no uso de microrganismos promotores de solubilização de fontes de nutrientes de baixa reatividade. Nesse contexto podem ser utilizados minerais fosfatados, minerais de potássio, assim como óxidos minerais entre outros minerais de baixa reatividade/solubilidade. Os resultados mostram o fungo filamentososo *Aspergillus niger* C como um bom agente promotor de solubilidade de minerais fosfatados e de potássio. Compósitos fertilizantes foram desenvolvidos a partir de um processo de gelatinização de amido com simultânea dispersão de um mineral fosfatado e encapsulamento desse microrganismo. Este compósito aumentou a solubilidade do fosfato presente no mineral quando bioativado em solo. Estes resultados suportam o desenvolvimento de uma nova classe de biofertilizantes inteligentes, possibilitando novas aplicações e estudos para avaliar formulações com minerais pouco solúveis como fonte de nutrientes para as plantas.

Palavras-chave: Solubilização biológica, ácidos orgânicos, *Aspergillus niger*, fertirrigação, compósitos fertilizantes.

BIOFERTILIZERS FROM THE USE OF NUTRIENTS SOURCES OF LOW REACTIVITY AND MICRORGANISMS SOLUBILIZING

Abstract: The increase in food productivity is directly linked to the increase in fertilizer consumption in agriculture. However, classical fertilizer production methods can have environmental impacts and human health. Therefore, this study aims to present an alternative method for the production of biofertilizers, based on use of microorganisms that promote solubilization of low reactive nutrient sources. In this strategy can be used phosphate minerals, potassium minerals, as well as mineral oxides among other low reactivity/solubility minerals. The results show that the filamentous fungus *Aspergillus niger* C as a good agent to promote increased solubility of phosphate and potassium minerals. Composites fertilizer were developed based in starch gelatinization process with simultaneous dispersion of ground phosphate mineral and encapsulation of this microorganism, these composites increased the solubility of phosphate mineral dispersed were bioactivated in soil. These results support the development of a new class of smart biofertilizer, which could open up new applications for formulations and studies containing poorly soluble mineral as source of nutrients to plants.

Keywords: Biological solubilization, Organic acids, *Aspergillus niger*, Fertigation, Composites fertilizers.

1. Introdução

O aumento da população mundial gera uma maior demanda por alimentos, e conseqüentemente a busca pelo desenvolvimento de tecnologias para aumento da produtividade.

Estudos mostram que a produtividade agrícola no Brasil entre os anos de 1970 e 2001 aumentou 3,5 vezes enquanto a área cultivada aumentou apenas 1,5 vezes, em paralelo a produção de fertilizantes aumentou 4,4 vezes (FAO, 2003). Portanto, observa-se uma relação direta do aumento de produtividade com o aumento do uso de fertilizantes na agricultura. Os métodos clássicos de produção de fertilizantes são danosos ao meio ambiente causando impactos prejudiciais a atmosfera a partir da geração de resíduos sólidos e efluentes gasosos (CONLEY et al., 2009; NEMERY; GARNIER; 2016). Neste trabalho, mostramos um método alternativo baseado no uso de microrganismos promotores de solubilização para a produção de fertilizantes a partir de fontes de nutrientes de baixa reatividade como minerais fosfatados (para produção de biofertilizantes fonte de P), minerais de potássio (para produção de biofertilizantes fonte de K) e óxidos minerais que podem ser utilizados como fonte de micronutrientes.

Nesse processo o microrganismo desempenha papel fundamental na solubilização do mineral e na liberação do composto na forma química assimilável pelas plantas. O principal mecanismo de solubilização é a acidulação natural produzida por microrganismos pela produção de ácidos orgânicos. Para os minerais fosfatados, geralmente pertencentes ao grupo das apatitas ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$), os ácidos orgânicos podem quelatar o cálcio presente na estrutura química do mineral e liberar o grupo fosfato para o meio, promovendo assim a solubilização (MENDES et al., 2014; KLAIC et al., 2017a). Um processo similar acontece para os minerais fonte de potássio (MEENA, MAURYA e VERMA, 2014) e para os óxidos minerais (KLAIC et al., 2017b). Portanto, partindo do princípio de produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos pode-se conduzir um processo de cultivo submerso (CS) para promover a solubilização de um mineral alvo, adicionado junto ao meio de cultivo, como por exemplo a rocha fosfática (KLAIC et al., 2017a; 2018a). O produto resultante é um meio líquido rico no macronutriente P, que pode ser utilizado para fertirrigação. O cultivo em estado sólido (CES) também pode ser utilizado para promover a solubilização destes minerais (KLAIC et al., 2018a). Estes processos também têm por vantagem a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono/energia para o crescimento dos microrganismos e a produção de ácidos orgânicos (FARINAS, 2015).

Uma segunda estratégia que vem sendo desenvolvida em nosso grupo de pesquisa é o desenvolvimento de compósitos fertilizantes bioativados por microrganismos (KLAIC et al., 2018b; GUIMARÃES et al., 2018). Entretanto, o desafio é desenvolver um material que favoreça a interação de partículas de minerais com simultâneo encapsulamento de microrganismos solubilizadores em um único grânulo, a fim de promover maior viabilidade às células microbianas. Deste modo, este trabalho tem por objetivos: (1) selecionar um microrganismo eficiente para promover a solubilização tanto de minerais de fosfato como de potássio; (2) mostrar uma potencial forma de produção e aplicação desses microrganismos na agricultura por processos fermentativos e desenvolvimento de novos materiais (compósitos fertilizantes); e (3) contextualizar a atuação do grupo de pesquisa na área da produção de biofertilizantes.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais e microrganismos

A rocha fosfática (30% P_2O_5) utilizada é proveniente da região de *Sechura* (Peru) e a rocha potássica (8,35% K_2O) é natural da região de Poços de Caldas (Minas Gerais, Brasil). Os isolados utilizados neste trabalho foram *Aspergillus niger* C (BRMCTAA 82), *Aspergillus niger* 3T5B8, *Aspergillus niger* F12 e *Aspergillus* 763, (pertencentes a coleção Embrapa Agroindústria de Alimentos - Rio de Janeiro, RJ) e *Aspergillus niger* ATCC 9142 (coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello), *Trichoderma harzianum* LQC 99 e *Trichoderma asperellum* LQC96 (pertencentes a Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna, SP).

2.2. Solubilização biológica por cultivo submerso

O processo de solubilização biológica da rocha fosfática e de potássio foi conduzida conforme descrito por Klaic et al. (2017a). O meio nutriente utilizado no pré-cultivo da rocha

fosfática foi o Pikovoskaya (1948) e no cultivo, adicionou-se 0,5% de rocha Bayóvar ao meio NBRIP descrito por (NAUTIYAL, 1999). Para o pré-cultivo e solubilização da rocha potássica foi utilizado uma adaptação do meio líquido Aleksandrov (ALEKSANDROV; BLAGODYR; ILEV, 1967): 1% glicose; 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,0005% $FeCl_3$; 0,01% $CaCO_3$; 0,2% $CaPO_4$ e pH 7,0, e para o cultivo submerso foi adicionado 2% de rocha potássica. O pré-cultivo de ambas as rochas foi realizado com 10^7 esporos/ml por 48 h em uma incubadora agitadora orbital, a 30 ° C e 220 rpm. As solubilizações das rochas foram iniciadas transferindo 10% da suspensão pré-cultivo para os meios contendo as rochas.

2.3. Compósitos fertilizantes

Compósitos contendo amido, rocha fosfática Bayovar, e esporos de *Aspergillus niger* C foram preparados a partir do processo de gelatinização do amido 5% p/v em uma solução de água destilada com 1% p/v de glicerol, conforme a metodologia descrita por Klačic et al., 2018.

2.4. Análises químicas

A quantificação do P solubilizado foi realizada conforme a metodologia de Murphy e Riley (1986), sendo sua concentração determinada por espectrometria UV-Vis em 880 nm. A determinação do K solubilizado foi realizado por espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS), utilizando um instrumento Perkin Elmer PinAAcle 900T operado no modo de atomização da chama no comprimento de onda de 766,49 nm, largura de fenda de 0,7 nm e mistura de chama de ar sintético a 10 L min⁻¹ e acetileno a 2,50 L min⁻¹.

3. Resultados e Discussão

3.1. Solubilização biológica de nutrientes de baixa reatividade

Os experimentos realizados neste estudo evidenciaram o potencial da cepa de *A. niger* C como um microrganismo promotor de solubilização, tanto para minerais fosfáticos como para os minerais de potássio (Figura 1). Estudos similares também demonstraram o potencial desse microrganismo na promoção do aumento da solubilidade de óxidos minerais (KLAIC et al., 2017b), assim como outros tipos de minerais fosfatados tanto por cultivo submerso (CS) como por cultivo estado sólido (CES) (KLAIC et al. 2017a; KLAIC et al., 2018a).

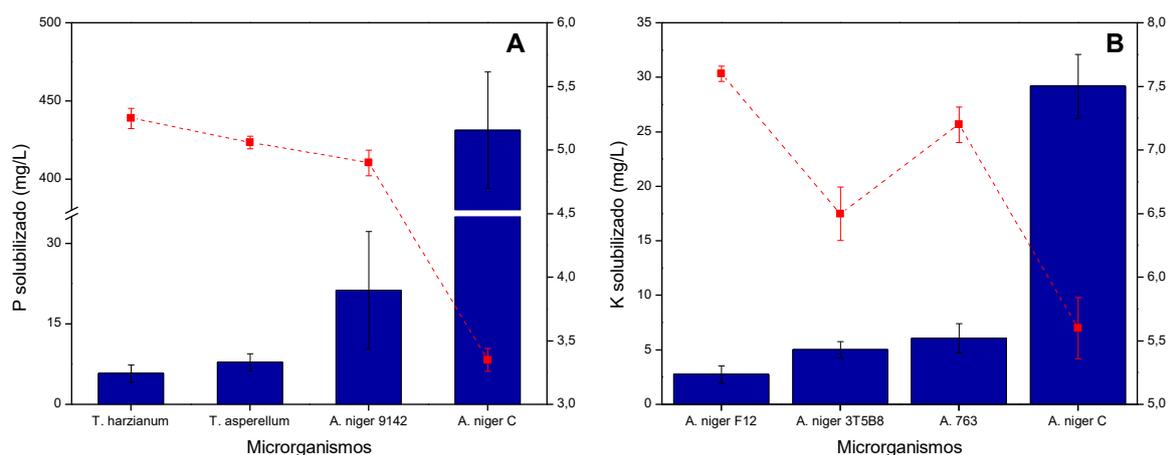


Figura 1. Seleção de microrganismos solubilizadores de rochas naturais. (a) Rocha Bayóvar (0,5%) por 120h; (b) Rocha Poços de Caldas (2%), por 96h. Experimentos realizados em triplicata, calculando média \pm desvio padrão, em shaker a 30°C e 220 rpm.

Com base nos pHs finais de cultivo observa-se que o *A. niger* C foi capaz de produzir uma maior acidificação no meio quando comparado aos demais fungos avaliados, comprovando que o mecanismo de solubilização desses minerais se dá pela produção de ácidos orgânicos assim como

descrito em outros trabalhos na literatura (NAUTIYAI, 1999; KLAIC et al., 2017a; KLAIC et al., 2018a). Portanto, ressalta-se o potencial desta cepa de *A. niger* como agente solubilizador de diferentes tipos de minerais de baixa reatividade e a versatilidade para ser utilizada tanto em CS como em CES. A direta aplicação destes microrganismos pré-selecionados ao solo, como inoculantes agrícolas, também pode ajudar a aumentar da disponibilidade de nutrientes presentes no próprio solo, mas que se encontram em formas químicas insolúveis.

3.2. Compósitos fertilizantes bioativados por microrganismos

Uma vez evidenciado o *Aspergillus niger* C como um microrganismo eficiente para promover o aumento de solubilidade de diferentes minerais e na produção de fertilizantes líquidos para fertirrigação, produziu-se, utilizando o mesmo princípio, fertilizantes granulares - compósitos fertilizantes bioativados por microrganismos (Figura 2). O mineral alvo (neste caso rocha fosfática Bayóvar) foi dispersado em uma matriz de amido, produzida por processo de gelatinização onde os esporos do fungo *Aspergillus niger* C também foram dispersos e encapsulados nesta matriz. O amido gelatinizado oferece características vantajosas para uso como matriz, uma vez que é um polímero natural, de baixo custo, abundante e biodegradável. Além disso, a matriz polissacarídica pode ser metabolizada pelo microrganismo fornecendo energia para o seu crescimento e a produção de ácidos orgânicos. Após o processamento, o material passou por processo de secagem a temperatura de 40 °C por 12 h e foi posteriormente moído, obtendo assim um compósito fertilizante granular, como mostrado na Figura 2A.

A Figura 2B, mostra o esporo de *A. niger* encapsulado na matriz de amido junto de partículas de rocha fosfática dispersas. Quando adicionado ao solo e na presença de umidade esse material é bioativado. O microrganismo se prolifera no grânulo consumindo a matriz de amido e produzindo ácidos orgânicos. Klaic et al. (2018b) mostraram a eficiência desta estratégia ao produzir compósitos com rocha fosfática Bayóvar, e após a bioativação dos microrganismos em meio líquido foi observado uma solubilização de 70% do fósforo total presente no material, enquanto que para o experimento controle (quando apenas a rocha fosfática estava presente) a solubilização do fósforo não ultrapassou 1%.

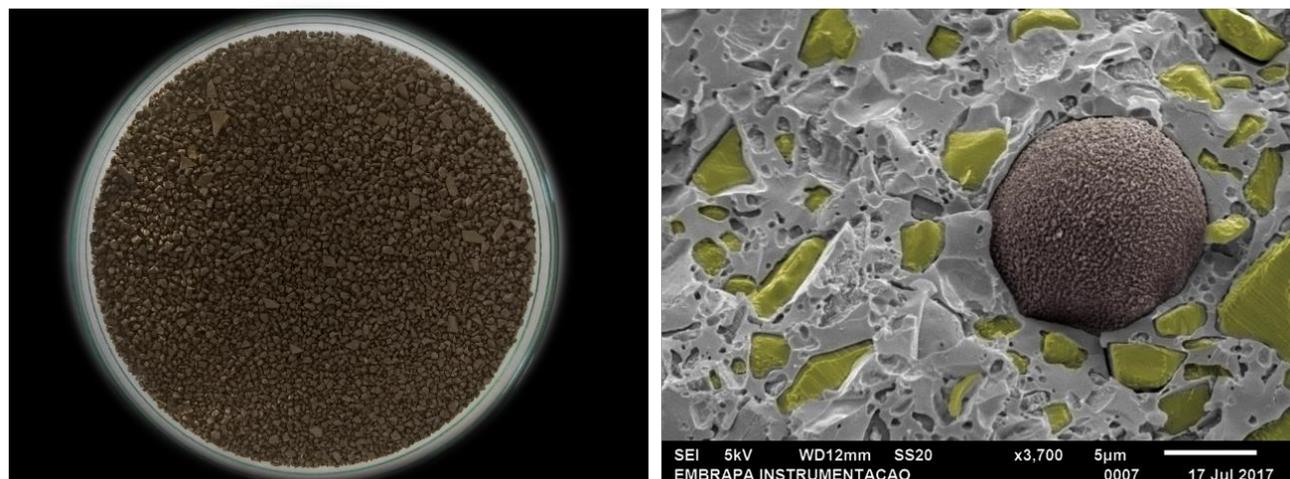


Figura 2. A) Imagem do compósito fertilizante produzido na forma de grânulos. B) Esporo de *Aspergillus niger* encapsulado na matriz de amido e partículas do mineral disperso.

4. Conclusões

O fungo filamentososo *Aspergillus niger* C mostrou o melhor potencial entre os microrganismos avaliados para solubilizar diferentes tipos de minerais, enquanto os compósitos produzidos evidenciam que é possível desenvolver rotas alternativas para produção de biofertilizantes líquidos e granulares utilizando microrganismos solubilizadores a partir de fontes de nutrientes de baixa solubilidade. As composições, bem como os microrganismos utilizados,

demonstram a capacidade de utilização desses biofertilizantes. Esse trabalho possui cunho inovador, servindo como base para produção de diferentes formulações, contendo outros tipos de minerais pouco solúveis como fonte de nutrientes para as plantas. Contudo, pesquisas ainda estão sendo realizadas para melhorar o processo de solubilização biológica e diminuir custos de produção.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Os autores também agradecem a Embrapa Instrumentação, laboratório de Agroenergia e ao laboratório de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LNNA) por darem suporte ao desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

- ALEKSANDROV, V. G.; BLAGODYR, R. N.; ILEV, I. P. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Mikrobiolo. Hichnyi.Zhurnal (Kiev)*, v. 29, p. 111-114, 1967.
- CONLEY, D. J.; PAERL, H. W.; HOWARTH, R. W.; BOESCH, D. F.; SEITZINGER, S. P.; HAVENS, K. E.; LANCELOT, C.; LIKENS, G. E. Ecology Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science*, v. 323, 1014-1015, 2009.
- FAO (Food and Agriculture Organization). *World Agriculture: Towards 2015/2030 an FAO Perspective*. BRUINSMA, J (Ed.). Rome, Earthscan Publications Ltd., 2003. 97p.
- FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 52, 179-188, 2015.
- GUIMARÃES, G. G. F.; KLAIC, R.; GIROTO, A. S.; MAJARON, V. F.; AVANSI, W.; FARINAS, C. S.; RIBEIRO, C. Smart fertilization based on sulfur-phosphate composites: synergy among materials in a structure with multiple fertilization roles. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 6, 12187-12196, 2018.
- KLAIC, R.; PLOTTEGHER, F.; RIBEIRO, C.; ZANGIROLAMI, T. C.; FARINAS, C. S. A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. *International Journal of Mineral Processing*, v. 161, 50-58, 2017a.
- KLAIC, K.; GUIMARÃES G. F.; FRANCECHINELLI, M., ZANGIROLAMI, C. T.; RIBEIRO, C.; FARINAS, S. Bioativação de óxidos metálicos: uma estratégia para aumentar a solubilidade de óxidos como fonte de micronutrientes. In: 5º Workshop Brasileiro de Fertilizantes. 2017b.
- KLAIC, R.; PLOTTEGHER, P.; RIBEIRO, C.; ZANGIROLAMI, T. C.; FARINAS, C. S. A Fed-Batch Strategy Integrated with Mechanical Activation Improves the Solubilization of Phosphate Rock by *Aspergillus niger*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 6 (9), 11326-11334, 2018a.
- KLAIC, R.; GIROTO, A. S.; GUIMARÃES, G. G. F.; PLOTTEGHER, F.; RIBEIRO, C.; ZANGIROLAMI, T. C.; FARINAS, C. S. Nanocomposite of starch-phosphate rock bioactivated for environmentally-friendly fertilization. *Minerals Engineering*, v. 128, 230-237, 2018b.
- MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P. Does a rhizospheric microorganism enhance k⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, v. 169, p. 337-347, 2014.
- MEENA, V. S. BAHADUR, I.; MAURYA, B. R.; KUMAR, A.; MEENA, R. K.; MEENA, S. K.; VERMA, J. P. Potassium-Solubilizing Microorganism in Evergreen Agriculture: An Overview, Elsevier Academic Press, 2016. 331 p.
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. Citation-classic - a modified single solution method for the determination of phosphate in natural-waters. *Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences*, v. 12, 16-16, 1986.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Fems Microbiology Letters*, v. 170, p. 265-270. 1999.
- NEMERY, J.; GARNIER, J. Biogeochemistry The fate of phosphorus. *Nature Geoscience*, v. 9, 343-344, 2016.
- PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorous in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, v. 17, p. 362-370. 1948.
- MENDES, G. D.; DE FREITAS, A. L. M.; PEREIRA, O. L.; DA SILVA, I. R.; VASSILEV, N. B.; COSTA, M. D., Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, v. 64, 239-249, 2014.